

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年2月20日 (20.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/014354 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/52, 9/00, C07B
61/00, G01N 33/48 // G06F 17/30, 17/50

光市 丸山台 2-2 6-2 Saitama (JP). 坂本 健作
(SAKAMOTO,Kensaku) [JP/JP]; 〒 120-0044 東京都
足立区 千住緑町 2-1 0-1 5-8 0 3 Tokyo (JP). 平
尾一郎 (HIRAO,Ichiro) [JP/JP]; 〒 351-0036 埼玉県 朝
霞市 北原 2-7-9-4 0 3 Saitama (JP). 横山 茂之
(YOKOYAMA,Shigeyuki) [JP/JP]; 〒 113-0023 東京都
文京区 向丘 1-2 0-6-6 0 7 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00118

(22) 国際出願日: 2002年1月11日 (11.01.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 佐伯 審生 (SAEKI,Norio); 〒 103-0027 東京都
中央区 日本橋三丁目 15番 2号 高愛ビル 9階 Tokyo
(JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(国内): CA, JP, US.

(30) 優先権データ:
特願2001-234135 2001年8月1日 (01.08.2001) JP

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒 332-0012 埼玉県 川口市
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

(72) 発明者; および

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 木賀 大
介 (KIGA,Daisuke) [JP/JP]; 〒 351-0112 埼玉県 和

(54) Title: TYROSYL-TRNA SYNTHASE VARIANTS

(54) 発明の名称: チロシル t RNA 合成酵素変異体

(57) Abstract: Tyrosyl-tRNA synthases having a modified amino acid sequence whereby unnatural amino acids can be more efficiently incorporated than original natural amino acids. More specifically, tyrosyl-tRNA synthases having been modified at the amino acid(s) at the 37- and/or 195-positions. A method of modifying tyrosyl-tRNA synthase characterized in that the position of an amino acid to be modified is determined based on the 3-D structure of an ANP complex of tyrosyl synthase and an amino acid to which this enzyme binds.

(57) 要約:

本発明は、元の天然のアミノ酸よりも非天然のアミノ酸をより効率よく取り込むことができるアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素に関する。具体的には、37位及び／または195位のアミノ酸が改変されたチロシル t RNA 合成酵素に関するものである。また、チロシル合成酵素と当該酵素が結合するアミノ酸のAMP複合体の3-D構造に基づいて改変すべきアミノ酸の位置を決定することを特徴とするチロシル t RNA 合成酵素の改変方法に関する。

WO 03/014354 A1

明細書

チロシル t RNA 合成酵素変異体

技術分野

本発明は、チロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変して、元の天然のチロシンよりも非天然型の 3 位置換チロシンをより効率良く取り込むことができるアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素、好ましくはアミノ酸が 2 個以上改変されたチロシル t RNA 合成酵素の変異体に関するものである。本発明のアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素は、元の天然のチロシンよりも非天然型の 3 位置換チロシン、例えば 3-ヨードチロシンをより効率良く取り込むことができ、野生型チロシル t RNA 合成酵素の基質であるチロシンより強く利用することができるので、これを用いて非天然のアミノ酸を選択的に、かつ位置選択的に含有する蛋白質（アロタンパク質）を高効率で製造することができる。

背景技術

タンパク質のある残基のアミノ酸を、通常蛋白質合成に関わる 20 種類以外のアミノ酸（以下非天然型アミノ酸と呼ぶ）に置換した変異型タンパク質が作製されている。このような、非天然型アミノ酸を取り込んだタンパク質は、アロタンパク質 (alloprotein) と呼ぶことが提唱されている (Koide et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 85 (1988) pp 6237-41)。特定の残基を、非天然アミノ酸にも置換できることは、20 種類の天然アミノ酸相互の間で置換した場合と比べて、よりきめ細やかで、系統的な改変が可能になる。また、特徴的な蛍光特性を持つアミノ酸、光によって構造を制御できるアミノ酸、光クロスリンクカーとして利用できる反応基を備えたアミノ酸などをタンパク質に導入することも行われている。

アロタンパク質を生産するためには、いくつかの手法がある。コイデ (Koide) らは、培地に加えた非天然アミノ酸を、大腸菌に取り込ませ、特定の一種類の天

然アミノ酸の代わりにその非天然アミノ酸を使用して、大腸菌にアロタンパク質を生産させた。しかしながらこの手法では、通常のアミノ酸と、非天然型アミノ酸を、合わせて20種類しか用いることができない (Koide et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 85 (1988) pp 6237-41)。

別 の方法では、事前に別の系でアミノアシル化されたサブレッサーtRNAを、無細胞翻訳系に投入することで、アロタンパク質が生産されている (Noren et al., Science, vol 244 (1989) pp182-8)。この方法の難点としては、大量にアミノアシルtRNAを調製する必要がある点が挙げられる。

非天然アミノ酸を含む21種類のアミノ酸を含んだタンパク質をさらに大量に調製するためには、非天然型アミノ酸を結合するtRNAが、翻訳反応を行う系の中で専用のアミノアシルtRNA合成酵素 (aaRS) によってアミノアシル化される人工遺伝暗号系を構築することが必要である。アミノアシルtRNA合成酵素はアミノ酸とtRNAとを特異的に結合させる酵素であり、生物種毎に、一部の例外を除き天然に存在する20種類のアミノ酸それぞれに対応して20種類存在する。細胞内にはこの様なaaRSがアミノ酸ごとに基本的に一種類存在することで、遺伝暗号に割り当てられるアミノ酸の種類が決まっている。例えば、アミノアシルtRNA合成酵素 (aaRS) のひとつであるチロシルtRNA合成酵素 (TyrRS) は、チロシンtRNAを他のアミノ酸のtRNAから識別してこれにチロシンにしか結合させず、他のアミノ酸とは結合させない。

ところで、ワング (Wang) らは、O-メチルチロシンを特異的にアミノアシル化するように改変したメタノコッカスジャナシイ (*Methanococcus janasii*) 由来のTyrRS変異体と、同生物由来のチロシンtRNAを改変したアンバーサブレッサーtRNAを大腸菌の中で発現させた (Wang et al., Science, vol 292 (2001), pp498-500)。このメタノコッカスジャナシイ (*Methanococcus janasi*) のTyrRS、チロシンtRNAはそれぞれ大腸菌のtRNA、aaRSと反応しない。このため、この研究で、O-メチルチロシンがアンバーコドンに特異的に導入されることが報告されている。

このような人工遺伝暗号系の構築のためには、ホストのaaRSと反応しないaaRS・tRNAの組を見出だすことと、非天然型アミノ酸と特異的に反応す

る a a R S 変異体の開発を行うことが重要である。非天然型アミノ酸と特異的に反応する a a R S は、現在までに前述の O-メチルチロシンに特異的な T y r R S 改変体しか知られていない。

3 位置換チロシンアナログには、細胞間情報伝達にかかる D O P A や、タンパクの部位特異的ラベルの標的部位となりうる 3-ヨードチロシンなどがあり、これらは生理活性を發揮する非天然型アミノ酸として知られている。したがって、3 位置換チロシンアナログに特異的な T y r R S を得ることが求められている。このような 3 位に置換体を持つチロシンアナログを、チロシンよりも効率よく取り込む T y r R S 変異体は今のところ知られていない。3 位に置換基を持つチロシンアナログを野生型 T y r R S よりも効率よく取り込む T y r R S 変異体は学会で報告されているが、この変異体はチロシンとチロシンアナログを同程度の効率で取り込んでしまうので、タンパク質の特定の位置に非天然型アミノ酸のみを挿入することには不適当である。

発明の開示

本発明は、非天然型アミノ酸、より詳細にはチロシンのフェニル基の 3 位に置換基を有する 3 位置換チロシンを優先的に取り込むことができる新規なチロシル t R N A 合成酵素を提供する。さらに詳細には非天然型アミノ酸が 3-ヨードチロシンなどのチロシンの 3-ハロチロシンである新規なチロシル t R N A 合成酵素を提供する。

また、本発明は、非天然型の 3 位置換チロシンを優先的に取り込むことができる新規なチロシル t R N A 合成酵素を用いて、タンパク質生産系により非天然型アミノ酸を含有する蛋白質（アロタンパク質 (alloprotein)）を製造する新規な方法を提供する。

さらに、本発明は、非天然型の 3 位置換チロシンをより優先的に効率良く取り込むことができるチロシル t R N A 合成酵素をデザインするための方法、及びこのような方法でデザインされたチロシル t R N A 合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された細胞の提供とその細胞内での非天然アミノ酸を含むタンパク質の生産、また、デザインされたアミノアシル t R N A 合成酵素を添加された無細胞

翻訳系における、非天然アミノ酸を含むタンパク質の生産手段を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のアミノアシルtRNA合成酵素の変異体を、酸性ポリアクリルアミド電気泳動と同じ方法によりアッセイしたアミノアシル化活性の結果を示す図面に代わる写真である。

第2図は、小麦胚芽無細胞翻訳系におけるアンバーサプレッションを示す。¹⁴C-ロイシンでラベルされた翻訳産物を、SDS-PAGEで解析した。アンバーサプレッションは、TyrRS-VC変異体、サプレッサーtRNAの両者がともに存在するときにのみ観察された。ambは、32番目のコドンをアンバーコドンに置換したmRNAであり、sup tRNAは大腸菌tRNATyr由来のアンバーサプレッサーtRNAである。

第3図は、小麦胚芽無細胞翻訳系の、系内にヨードチロシン、ヨードチロシンに特異的なTyrRS-VC変異体、サプレッサーtRNAを含んだ場合の翻訳産物のLC-MS解析の液体クロマトグラフィーのチャートを示す。

K3とK9はそれぞれ、Rasタンパク質のリジルエンドペプチダーゼ消化フラグメントである、Ser17-Lys42のフラグメントと、Thr148-Lys167のフラグメントであることが、質量分析によりわかった。チャート上段および下段はそれぞれ、アンバーコドンを含まないmRNA、32番目のコドンがアンバーコドンであるmRNAそれぞれの翻訳産物の解析を示す。K3フラグメントのチロシン1残基がヨードチロシンに置換した質量に対応する質量を持つフラグメント(K3-IY32)がアンバーサプレッションの産物の解析(下段)に見い出された。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、チロシルtRNA合成酵素のアミノ酸配列を改変して、元の天然のチロシンよりも非天然の3位置換チロシンをより効率良く取り込むことができるアミノ酸配列が改変されたチロシルtRNA合成酵素に関する。より詳細に

は、チロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列をその立体構造に基づいて標的チロシンを認識すると推定される位置のアミノ酸の 2箇所以上を他のアミノ酸に改変して非天然型アミノ酸であるチロシンの 3 位置換体アミノ酸を効率よく、かつ選択的に取り込むことができるチロシル t RNA 合成酵素に関する。

また、本発明は、チロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変することにより、元の天然のチロシンよりも非天然の 3 位置換チロシンをより効率良く取り込むことことができるアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素を製造する際に、チロシル t RNA 合成酵素がチロシン又はチロシンの AMP 複合体と結合する位置のアミノ酸を 3-D 構造に基づいて決定し、当該アミノ酸を他のアミノ酸に改変、好ましくは 2 個以上のアミノ酸を他のアミノ酸に改変することを特徴とするチロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変する方法に関する。

さらに、本発明は、本発明のアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素を用いて、非天然のアミノ酸を含有する蛋白質を製造する方法に関する。より詳細には、アミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素を用いて、非天然型アミノ酸であるチロシンの 3 位置換チロシンを含有してなる蛋白質を製造する方法に関する。

また、本発明は、本発明のアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素をコードする遺伝子により形質転換された細胞と、そのような細胞内における非天然アミノ酸を含むタンパク質の生産、また、デザインされたアミノアシル t RNA 合成酵素を添加された無細胞翻訳系における、非天然アミノ酸を含むタンパク質の生産手段に関する。

本発明者らは、アロタンパク質を効率よく、選択的に、かつ大量に製造できる方法について検討してきており、そのために非天然型アミノ酸を優先的に効率よく取り込むことができるアミノアシル t RNA 合成酵素の開発を行ってきた。チロシル t RNA 合成酵素 (Ty r R S) は、アミノアシル t RNA 合成酵素の 1 種であり、本発明者らはチロシンの 3 位置換体がそれ自体で種々の生理活性を有することからチロシンアナログを認識するチロシル t RNA 合成酵素 (Ty r R S) に着目した。また、大腸菌由来の Ty r R S は真核生物のチロシン t RNA と、大腸菌由来のチロシン t RNA は真核生物の Ty r R S とそれぞれ反応しな

いことが知られているので、3位置換チロシンアナログに特異的なTyrRSはタンパク質に部位特異的に非天然アミノ酸を取り込むための人工遺伝暗号系の構築の材料として有望である。

したがって、以下ではアミノアシルtRNA合成酵素の具体的な例としてチロシルtRNA合成酵素(TyrRS)を挙げて説明する。

本発明者らは、3位置換チロシンアナログに特異的なTyrRSを得るために、酵素の基質結合部位のアミノ酸を改良することを検討した。大腸菌由来のTyrRSのアミノ酸配列は既に知られており、これを配列表の配列番号1に示すと共に、以下にアミノ酸の1文字表記を用いてそのアミノ酸配列を示す。

M A S S N L I K Q L	Q E R G L V A Q V T	D E E A L A E R L A	30
Q G P I A L Y C G F	D P T A D S L H L G	H L V P L L C L K R	60
F Q Q A G H K P V A	L V G G A T G L I G	D P S F K A A E R K	90
L N T E E T V Q E W	V D K I R K Q V A P	F L D F D C G E N S	120
A I A A N N Y D W F	G N M N V L T F L R	D I G K H F S V N Q	150
M I N K E A V K Q R	L N R E D Q G I S F	T E F S Y N L L Q G	180
Y D F A C L N K Q Y	G V V L Q I G G S D	Q W G N I T S G I D	210
L T R R L H Q N Q V	F G L T V P L I T K	A D G T K F G K T E	240
G G A V W L D P K K	T S P Y K F Y Q F W	I N T A D A D V Y R	270
F L K F F T F M S I	E E I N A L E E E D	K N S G K A P R A Q	300
Y V L A E Q V T R L	V H G E E G L Q A A	K R I T E C L F S G	330
S L S A L S E A D F	E Q L A Q D G V P M	V E M E K G A D L M	360
Q A L V D S E L Q P	S R G Q A R K T I A	S N A I T I N G E K	390
Q S D P E Y F F K E	E D R L F G R F T L	L R R G K K N Y C L	420
I C W K			424

本発明者らは、この中のどのアミノ酸を改变すべきかに付いて検討し、他のアミノ酸を導入する位置を次のようにして決定した。中等度高熱菌のTyrRSとチロシル-AMPの複合体の3-D構造については、既に報告されており(Brick,

et al., J. Mol. Bio., vol 208 (1988) pp83-)、この3-D構造に基づいて3位置換チロシンアナログを組み込むべき位置を推定した。これは中等度高熱菌におけるTyrRSとチロシル-AMPの複合体との関係であるが、本発明者らはTyrRSの生物種間の保存性が高いことから、他の生物由来のTyrRSについても同様に考えることができると推測した。

この3-D構造モデルに基づいて、本発明者らは、大腸菌のTyrRSを、3位置換チロシンアナログを組み込むために変異を導入すべき位置として37位および195位のアミノ酸を見出した。野生型のTyrRSにおける37位のアミノ酸はチロシン(Y)であり、195位のアミノ酸はグルタミン(Q)である。前記したアミノ酸配列に下線を引いている箇所である。

まず、大腸菌TyrS遺伝子を含むプラスミドを鋳型とし、次のプライマー(1)、(2)を用いたPCRによって増幅した断片を、NdeI、HindIIIで切斷した後に、pET26bのNdeI-HindIII部位に組み込むことで、TyrRSの発現ベクターpET-YRSを作成した。

プライマー(1): 5'-GGAATTCCATATGGCAAGCAGTAACCTGATTAAACAATTGCAAG-3'

プライマー(2): 5'-GCCGAAGCTTGTGACTTCCAGCAAATCAGACAGTAATTCTTTACCG-3'

次に、37位及び／又は195位のアミノ酸を部位特異的に改変する方法を説明する。

まず、37位又は195位の1カ所のみのアミノ酸の置換体を作成した。37位および195位それぞれの1個のアミノ酸の置換体をコードするDNA配列を作成するために使用したプライマー(3)から(8)を次に示す。

プライマー(3): 5'-AGGATCGAAGCCGCAAGCGAGCGCGATCGGGCCTTGCGCC-3'

プライマー(4): 5'-AGGATCGAAGCCGCA^MNNAGCGCGATCGGGCCTTGCGCC-3'

Mは、C又はAを示し、Nは、A又はC又はG又はTを示す。

プライマー(5): 5'-ACGGTGTGGTGCTGTCTATTGGTGGTTCTGACC-3'

プライマー(6): 5'-ACGGTGTGGTGCTGGCAATTGGTGGTTCTGACC-3'

プライマー(7): 5'-ACGGTGTGGTGCTAACATTGGTGGTTCTGACC-3'

プライマー(8): 5'-ACGGTGTGGTGCTGTGCATTGGTGGTTCTGACC-3'

次に、37位及び195位の両方のアミノ酸が改変されたニアミノ酸置換体を作成した。

前記の工程で作成した37位および195位それぞれのアミノ酸置換体をコードするプラスミドから、プライマーを用いたオーバーラップ・エクステンション法でニアミノ酸置換体をコードするDNA配列を作成し、pET-YRSのNdeI-BamHI部位に導入した。オーバーラップ・エクステンション法は、プライマー(1)と(10)の組、プライマー(9)と(11)の組をそれぞれ用いて増幅した2つの断片を精製し、これらとプライマー(1)と(9)を用いたPCRで増幅することによって行った。

プライマー(1): 5'-GGAATTCCATATGGCAAGCAGTAAC TGATTAAACAATTGCAAG-3'

プライマー(10): 5'-GATCATCTGGTTAACGGAGAAGTGTGTTGCC-3'

プライマー(9): 5'-TTCTTCGGATCCAACCAGACTGCGCCGCCCTTC-3'

プライマー(11): 5'-GACCTTCCTGCGCGATATTGGCAAAC-3'

このようにして得られたアミノ酸の改変体とその記号を次の表1に示す。

表1 野生型及びアミノ酸の改変体の記号とアミノ酸の種類

記号	3 7 位	1 9 5 位
野生型	チロシン (Y)	グルタミン (Q)
3 7 A	アラニン (A)	グルタミン (Q)
3 7 V	バリン (V)	グルタミン (Q)
3 7 I	イソロイシン (I)	グルタミン (Q)
3 7 L	ロイシン (L)	グルタミン (Q)
1 9 5 S	チロシン (Y)	セリン (S)
1 9 5 C	チロシン (Y)	システイン (C)
1 9 5 N	チロシン (Y)	アスパラギン (N)
1 9 5 A	チロシン (Y)	アラニン (A)
A S	アラニン (A)	セリン (S)
V S	バリン (V)	セリン (S)
I S	イソロイシン (I)	セリン (S)
L S	ロイシン (L)	セリン (S)
A C	アラニン (A)	システイン (C)
V C	バリン (V)	システイン (C)
I C	イソロイシン (I)	システイン (C)
L C	ロイシン (L)	システイン (C)
A N	アラニン (A)	アスパラギン (N)
V N	バリン (V)	アスパラギン (N)
I N	イソロイシン (I)	アスパラギン (N)
L N	ロイシン (L)	アスパラギン (N)
A A	アラニン (A)	アラニン (A)
V A	バリン (V)	アラニン (A)
I A	イソロイシン (I)	アラニン (A)
L A	ロイシン (L)	アラニン (A)

前記した工程で得られた完全な変異D N A フラグメントの各々を、プラスミド p E T Y R S 内のテンプレートフラグメントのもとの位置に挿入した。野生型及び変異型 t y r S 遺伝子を含むプラスミドで、ハナハンの方法 (Hanahan, D (J. Mol. Bio., 166, 557-580) に準じた形質転換法により、各々大腸菌 B L R (DE 3) に形質転換した。各々のプラスミドを有する形質転換体を単離し培養することにより、野生型及び変異型 T y r R S を発現させた。野生型及び変異型 T y r R S タンパク質を大腸菌粗抽出物から精製した。

得られた改変体について基質特異性のアッセイを行った。アッセイは、以下の 3 種のアッセイ方法を用いた。

第 1 の方法は、アミノアシル化反応の反応産物の 1 つであるピロリン酸をピロフォスファダーゼで分解して生産される無機リン酸を定量するロイド (Lloyd) らの方法 (Nucleic Acids Research vol23 (1995) pp2886-2892) を簡略化し、無機リンをBiomol green (フナコシ) を使用して検出することで、アミノアシル化反応の測定を行った。結果を表 2 及び表 3 に示す。

第 2 の方法は、ロイド (Lloyd) らの方法 (Nucleic Acids Research vol23 (1995) pp2886-2892) をそのまま行ったものである。結果を表 4 に示す。

第 3 の方法は、t R N A 全長に対するチロシンまたは 3 - ヨードチロシンに対するアミノアシル化活性を、ウォルフソン (Wolfson) ら (Wolfson, A.D. et al, RNA, 4 (1998), 1019-1023) に記載される酸性ポリアクリルアミド電気泳動と同様の方法によりアッセイした。結果を図面に代わる写真として第 1 図に示す。

表2 野生型およびアミノ酸変異酵素のアミノアシル化活性

	チロシン	3-ヨードチロシン
野生型	***	-
37A	***	***
37V	***	***
37I	**	***
37L	***	***
195S	***	*
195C	***	*
195N	***	*
195A	***	*

表中のマークは、 *** > ** > * > - の順に活性が高いことを示す。

それぞれ、 50 nM、 500 nM、 5 μM の酵素濃度で 4 分間 37 °C の反応で、 アミノアシル化反応がマイクロプレートリーダーにより検出できたことを示す。アミノ酸濃度は、 チロシン 200 μM、 3-ヨードチロシン 1 mM であった。

表 3 野生型、37V 及び二重変異酵素のアミノアシル化活性

	チロシン	3-ヨードチロシン
野生型	***	-
37V	***	***
A S	*	*
V S	**	**
I S	-	-
L S	-	-
A C	*	**
V C	*	**
I C	-	-
L C	*	*
A N	-	-
V N	-	**
I N	-	-
L N	*	-
A A	-	-
V A	*	**
I A	*	*
L A	*	-

表中のマークは、 *** > ** > * > - の順に活性が高いことを示す。

それぞれ、4分間37℃のアミノアシル化反応によって、酵素濃度25nMで強く、250nMで強く、250nMで弱く、反応が検出できたことを示す。アミノ酸濃度は、チロシン200μM、3-ヨードチロシン1mMであった。

表2は、野生型、8個の1個のアミノ酸を変異させた酵素のアミノアシル化活性を、表3は野生型、37V及び16個の二重変異酵素のアミノアシル化活性を

列記する。Tyr 37 及び Gin 195 の他のアミノ酸への置換により得られた酵素変異体に関して、3位置換チロシンアナログ（この実験では3-ヨードチロシン）に対するアミノアシル化活性を実質的に増加させた。一方、相対的に、これらのタンパク質の、チロシンについての特異的アミノアシル化活性は、減少する。それゆえ、これらの酵素変異体の相対的チロシンアナログ／チロシン比は野生型酵素のそれより高くなってくるものが出現した。

表4 二重変異酵素のアミノアシル化活性

<u>ピロリン酸の生成量の初速 (nMPPi/min/nM enzyme) , 37°C</u>		
	チロシン	3-ヨードチロシン
野生型	400	<0.05
37V	140	73
37A	51	12
AC	1.0	3.1
VC	0.9	9.5
VS	19	18
VN	2.1	6.9
VA	3.7	6.6

表4は、Nucleic Acids Research vol23(1995)pp2886-2892に記されているLioydらの方法で行った二重変異酵素のアミノアシル化活性を列記したものである。4つの二重変異酵素はTyr 37 及びGin 195 の両方の変異の利点を組み合わせる。例えば、VCの相対的チロシンアナログ／チロシン比は10を超え、その特異的アミノアシル化活性は、Gin 195 に更なる変異の導入のため、単一変異酵素37Vより高い。VN、VS、及びACは、相対チロシンアナログ／チロシン比及び特異的アミノアシル化活性においてVCより劣るが、一アミノ酸置換体よりも高い相対チロシンアナログ／チロシン比及び特異的アミノアシル化活性を有するものであった。

また、表4に示す結果から、位置37及び195における変異を組み合わせることは、その酵素の基質特異性を劇的に変化させ、3位置換チロシンアナログについてのアミノアシル化活性を増加させることができると結論づけることができた。酵素変異体の中で、VC、VN、及びACが最も注目すべき特性及び適用可能性を有することもわかる。

第1図は、二重変異酵素のアミノアシル化活性を示す図面に代わる写真である。最もチロシンアナログ/チロシン比が高いVCについて、実際にtRNAとの結合を調べることができる酸性PAGEによってアッセイを行った。その結果、VCは、チロシンアナログに対する特異性が高いことが判った。

得られたVCと、大腸菌チロシンtRNA由来のアンバーサプレッサーtRNAを用いて、コムギ胚芽の無細胞タンパク合成系のバッチ法による反応によって、ヨードチロシンを含有するタンパク質を作成することを試みた。目的タンパク質としては、そのC末に、スペーサー配列を介してHisタグを付加した短鎖型c-H-Ras (Milburn et al., Science vol 247 (1990) pp939-45)を用いた。このタンパク質の32番目のコドンをアンバーコドンに置換したコンストラクションから作成したmRNAを鋳型とした翻訳では、全長のタンパク質の生産は、TyrRS、サプレッサーtRNAの両方が存在することに依存した(第2図)。このことより、用いたサプレッサーtRNAが、コムギ胚芽内在性のアミノアシルtRNA合成酵素によってほとんどアミノアシル化されないことがわかる。アンバーサプレッションによる合成量は、アンバーコドンが無いコントロールの3-4割であった。タンパク質の合成量を増やすために、サプレッションによる反応を、透析法を用いて3日間行った。この場合の生産量は1mlの反応内液当たりに換算して0.1mg以上であり、タンパク質を用いた様々な実験を行うのに十分な量のタンパク質を合成できることがわかった。

実際にペプチド鎖のアンバーコドンに対応する位置にヨードチロシンが挿入されていることを質量分析によって調べた。Rasタンパクをニッケルビーズを用いて精製した後に、SDS-PAGEにかけた産物を染色して得られたRasの泳動度に対応するバンドを切り出してペプチダーゼ処理した断片を、LC-MS(液体クロマトグラフィー質量分析)によって分析した。レポータータンパク

として用いたRasタンパク質の32番目のコドンはチロシンに対応するコドンであるが、このコドンをアンバーコドンに改変したmRNAと、手を加えないmRNAからのそれぞれについて、反応溶液内にヨードチロシン、VC変異体、サプレッサーtRNAを全て翻訳系に添加した翻訳反応を行った。翻訳産物を消化したフラグメントのうち、N末から32番目のアミノ酸を含むフラグメント(Ser17-Lys42、K3フラグメントと称す)に着目して解析を行った。その結果、アンバーサプレッションによって生じたK3フラグメントには、1残基のチロシンがヨードチロシンが置換された質量に対応するものが大部分で、一部のみがヨードチロシンを含まない質量を持っていた。また、アンバーコドンに対応する部位に他のアミノ酸が誤って挿入されたK3フラグメントは検出されなかった。アンバーコドンに挿入されたヨードチロシンとチロシンの割合をクロマトグラムの吸光度から検討した結果、アンバーサプレッションによって、K3フラグメントの95%以上がヨードチロシンを含む一方、アンバーコドンに対応してチロシンが挿入された割合は5%以下であることがわかった。一方、通常のチロシンコドンにヨードチロシンが混入しないことを、アンバーコドンを含まないmRNAからの翻訳産物の解析では、チロシンの代わりにヨードチロシンを含んだ場合に対応する質量を持つフラグメントが検出されないことにより確認した。

本発明の方法をRasタンパク質を例にして説明したが、本発明の方法はRasタンパク質に限定されるものではなく、他のタンパク質についても同様に適用することができることは明らかである。

以上のように、チロシルtRNA合成酵素の具体例として大腸菌のTyrRSを挙げて説明してきた。大腸菌の野生型TyrRSにおいては、37位置のチロシン及び195位置のグルタミンを他のアミノ酸残基で変換することにより、非天然型アミノ酸である3位置換チロシン/チロシンの相対比が高いチロシル化活性を有する種々の酵素変異体を見出すことができることを具体例で示してきた。また、このような酵素変異体を得たことで、3位置換チロシンアナログを部位特異的に組み込んだタンパク質の生産に適用することが可能となった。

さらに、ここで使用した大腸菌野生型TyrRSの37位置および195位置のアミノ酸残基の生物種間保存性は極めて高いことから、他の生物種のチロシル

t RNA合成酵素の改変に本発明の方法を広く適用することができることは明らかである。

ここで利用した翻訳系は小麦胚芽無細胞翻訳系であるが、同様に他の真核生物由来の無細胞翻訳系や、真核細胞内においても、本発明で作成したVC変異体を用いることで非天然アミノ酸を部位特異的に導入することができることは明らかである。また、この酵素を利用することで、原核生物の翻訳系内で、全てのチロシン残基を非天然アミノ酸に置換したタンパク質を作成することが出来る。このようなタンパク質の作成は、他の原核生物由来のチロシルt RNA合成酵素を本発明と同様に改変することでも可能になる。一方、本発明と同様に真核生物または古細菌由来のチロシルt RNA合成酵素を改変することで、原核生物の翻訳系の中で非天然アミノ酸を部位特異的に含んだタンパク質を作成することが可能になる。

本発明は、チロシルt RNA合成酵素の酵素-基質特異性を変えた酵素変異体を提供することを目的としたものである。より詳細には、本発明は、効率よく、選択的に、かつ非天然型アミノ酸を含有するアロタンパク質を大量に製造することができるチロシルt RNA合成酵素の変異体を、チロシルt RNA合成酵素のアミノ酸配列を改変することにより調製することを特徴とするものである。

本発明のチロシルt RNA合成酵素は、非天然型アミノ酸として各種の生理活性を有することが知られている3-ヨードチロシンなどの3-ハロチロシン、3-ヒドロキシチロシンなどの3位置換チロシンを選択的に優先して効率良く取り込むことができる特徴とするものである。また、本発明のチロシルt RNA合成酵素は、大腸菌などの細菌類、酵母、動物、植物などのいずれの生物由来のものであってもよいが、前記で説明してきたように、3-D構造が既知の酵素と保存性が高いものが汎用性があることから好ましい。また、特定の生物に特異的なチロシルt RNA合成酵素であっても、この変異体が他の生物において害をなさないのであれば、その生物において新たなアミノ酸のチロシルt RNA合成酵素として作用することから好ましい変異体として使用することができる。

本発明のチロシルt RNA合成酵素のアミノ酸配列の改変する位置を決める方

法としては、チロシル t RNA 合成酵素と当該酵素が結合するアミノ酸又はアミノ酸のAMP複合体（アミノアシル化されたAMP及びアミノアシル化されたAMP類縁体など）の3-D構造に基づいて改変すべきアミノ酸の位置を決定するのが好ましいが、これに限定されるものではなく、前記で例示したチロシル t RNA 合成酵素の場合が37位や195位であったことに基づいて、他のクラスIアミノアシル t RNA 合成酵素のロスマンフォールドドメイン又はクラスIIアミノアシル t RNA 合成酵素の逆平行 β シートドメイン内の対応する部位に改変すべきアミノ酸の位置を決定することができる。

本発明は、このような改変すべき位置として2箇所以上のアミノ酸を選定することが好ましく、このことにより非天然型アミノ酸に対する選択性を飛躍的に向上させることができた。

3-D構造に基づいて改変すべきアミノ酸の位置を決定する場合には、まず目的のアミノ酸のアミノアシル t RNA 合成酵素の立体構造を解析し、この立体構造において目的のアミノ酸のAMP複合体が結合する位置を解析することにより改変すべきアミノ酸の位置を決定することができる。

また、前記の例では大腸菌由来のチロシル t RNA 合成酵素を用いてきたために、改変位置として37位及び195位を挙げてきたが、これは大腸菌の場合であって、他の生物由来のチロシル t RNA 合成酵素を用いる場合には、立体構造において大腸菌由来のチロシル t RNA 合成酵素の37位及び195位に相当する位置のアミノ酸が改変されるべき位置となる。本発明における「立体的に相当する位置」というのは、アミノアシル t RNA 合成酵素の立体構造においてアミノ酸又はアミノ酸のAMP複合体（アミノアシル化されたAMP及びアミノアシル化されたAMP類縁体など）を認識する位置に対応しているアミノ酸の位置をさしている。

チロシル t RNA 合成酵素に新たに導入するアミノ酸としては、アミノ酸の親水性や水素結合についての距離などを考慮して、例えば、その位置にアミノ酸のAMP複合体との結合を形成させないようにする場合には、疎水性のアミノ酸に改変したり、グルタミンをアスパラギンにするなどして距離を調整することができる。

本発明の前記した例では、チロシル tRNA 合成酵素の 37 位のチロシンをバリン、ロイシン、イソロイシン、又はアラニンで改変し、また 195 位のグルタミンをアラニン、システイン、セリン、又はアスパラギンで改変したが、これに限定されるものではない。

本発明の特定の位置のアミノ酸が他のアミノ酸で改変されたチロシル tRNA 合成酵素の変異体の製造方法としては、公知の遺伝子操作技術により行うのが好ましい。例えば、目的のアミノ酸の位置をコードする塩基配列を改変すべきアミノ酸をコードする塩基配列に置換したプライマーを用いて、改変すべきアミノ酸をコードする塩基配列に置換した DNA を増幅させて、増幅させた DNA 断片を結合させて全長のアミノアシル tRNA 合成酵素の変異体をコードする DNA を得て、これを大腸菌などの宿主細胞を用いて発現させることにより簡便に製造することができる。この方法において使用するプライマーとしては 20 ~ 70 塩基、好ましくは 20 ~ 50 塩基程度である。このプライマーは改変前の元の塩基配列とは 1 ~ 3 塩基がミスマッチとなるので、比較的長いもの、例えば 20 塩基以上のものを使用するのが好ましい。

また、本発明の特定の位置のアミノ酸が他のアミノ酸で改変されたチロシル tRNA 合成酵素の変異体の製造方法としては、前記した方法に限定されるものではなく、公知のポイントミューテーション技術や、制限酵素により改変断片を導入する方法など、各種の遺伝子操作技術を使用することができる。

本発明は、前記したチロシル tRNA 合成酵素の変異体をコードする DNA を用いて形質転換された細胞を提供する。このような細胞としては、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。

また、細胞内で発現した本発明のチロシル tRNA 合成酵素の変異体を、その細胞内でそのまま蛋白質合成に使用する場合には、その目的に応じた細胞を用いることができる。

形質転換する方法としては、公知の方法を採用することができる。

本発明は、前記してきた本発明のアミノ酸配列が改変されたチロシル tRNA 合成酵素の変異体を用いて、3 位置換チロシンの非天然型のアミノ酸を含有する蛋白質を製造する方法を提供する。前記したように、本発明の変異体は、10 倍

以上の選択性で非天然のアミノ酸を特異的に結合するものであるから、この変異体又はこの変異体をコードする遺伝子を細胞に導入して発現させることにより、天然のアミノ酸に代えて目的の非天然のアミノ酸が導入された蛋白質を製造することができる。

また、本発明のアミノ酸配列が改変されたチロシル tRNA 合成酵素の変異体は細胞内における使用のみならず、インビトロ（セルフリー系）における使用も包含している。

したがって、本発明は、アロタンパク質を効率よく、選択的に、特に位置選択的に、かつ大量に製造する方法を提供するものである。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1 (TyrRS 遺伝子の発現ベクターの調製)

野生型大腸菌 (E. coli) W3110 からチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) 遺伝子をクローニングした。次に、TyrRS 遺伝子を大腸菌のベクターである pET26b に挿入してプラスミド pET-YRS を作製した。

大腸菌 TyrRS 遺伝子を含むこのプラスミドを鋳型とし、次の塩基配列を有するプライマー (1)、(2)、

プライマー (1)

5'-GGAATTCCATATGGCAAGCAGTAAC TTGATTAAACAATTGCAAG-3'

プライマー (2)

5'-GCCGAAGCTTGTGACTTCCAGCAAATCAGACAGTAATTCTTTACCG-3'

を用いた PCR により増幅した断片を、NdeI、 HindIII で切断した後に、ベクター pET26b の NdeI-HindIII 部位に組み込むことで、TyrRS の発現ベクター pET-YRS を作成した。

実施例 2 (変異を導入する位置の決定)

Tyrosineの生物種間の保存性が高いので、既に報告されている中等度高熱菌のTyrosineとチロシル-AMPの複合体の3-D構造を用いて(Brick, et al., J. Mol. Bio., vol 208 (1988) pp83-)、3位置換チロシンアナログを組み込むために変異を導入すべき37位および195位を見出した。

実施例3 (部位特異的変異の導入)

改変するアミノ酸置換を含むオリゴヌクレオチドを各々プライマー(変異導入プライマー)(3)～(8)として常法により合成した。

(a) 1個のアミノ酸が置換された一アミノ酸置換体の作成

37位又は195位のそれぞれのアミノ酸の1個が置換された一アミノ酸置換体をコードするDNA配列を、次に示すプライマー(3)から(8)を用いて作成した。プライマー(3)及び(4)は、37位の改変のためのものである。また、プライマー(5)から(8)は195位の改変のためのものである。

プライマー(3) :

5'-AGGATCGAAGCCGCAAGCGAGCGCGATCGGCCTTGCGCC-3'

プライマー(4) :

5'-AGGATCGAAGCCGCAMNNAGCGCGATCGGCCTTGCGCC-3'

Mは、C又はAを示し、Nは、A又はC又はG又はTを示す。

プライマー(5) :

5'-ACGGTGTGGTGCTGTCTATTGGTGGTTCTGACC-3'

プライマー(6) :

5'-ACGGTGTGGTGCTGGCAATTGGTGGTTCTGACC-3'

プライマー(7) :

5'-ACGGTGTGGTGCTGAACATTGGTGGTTCTGACC-3'

プライマー(8) :

5'-ACGGTGTGGTGCTGTGCATTGGTGGTTCTGACC-3'

(b) 2個のアミノ酸が置換された二アミノ酸置換体の作成

37位および195位それぞれの一アミノ酸置換体をコードするプラスミドか

ら、プライマーを用いたオーバーラップ・エクステンション法でニアミノ酸置換体をコードするDNA配列を作成し、pET-YRSのNdeI-BamHI部位に導入した。オーバーラップ・エクステンション法は、プライマー(1)と(10)の組、プライマー(9)と(11)の組をそれぞれ用いて増幅した2つの断片を精製し、これらとプライマー(1)と(9)を用いたPCRで増幅することによって行った。

プライマー（1）：

5' -GGAATTCCATATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAACAATTGCAAG-3'

プライマー（10）：

5' -GATCATCTGGTTAACGGAGAAGTGTGTTGCC-3'

プライマー (9) :

5' -TTCTTCGGATCCAACCAAGACTGCGCCGCCTTC-3'

プライマー（11）：

5' -GACCTCCTGCGCGATATTGGCAAAC-3'

実施例 4 (野生型及び変異型 Ty r R S の発現)

前記した過程から得られた完全な変異DNAフラグメントの各々を、プラスミドpETYRS内のテンプレートフラグメントのもとの位置に挿入した。野生型及び変異型TyrRS遺伝子を含むプラスミドを、ハナハン(Hanahan, D)の方法(J. Mol. Bio., 166, 557-580)に準じて形質転換により、各々大腸菌BLR(DE3)を形質転換した。

各々のプラスミドを有する形質転換体を単離し、次に 16 時間、37℃で LB 培地中で培養した。野生型及び変異型 T y r R S タンパク質を、以下に記すように大腸菌粗抽出物から精製した。全ての作業は 4℃で行った。

10 mMイミダゾールを含む緩衝液A（50 mMトリス-10 mM Mg²⁺（OA
c）₂（pH 7.9）、0.3 M NaCl、5 mMメルカプトエタノール）で
平衡化したNi-アガロースカラム（0.5 mL）に適用した。40 mMイミダ
ゾールを含む緩衝液Aで洗った後、250 mMイミダゾールを含む緩衝液Aで溶
出した。その活性画分をプールし、緩衝液B（100 mMトリス-HCl（p

H₇.6)、40 mM KCl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT) に対して透析し、次に終濃度50%になるようにグリセロールを加えて-20℃で保存した。

上述の過程で、アラニン、バリン、イソロイシン、及びロイシンからなる群から選択されるアミノ酸による Tyr 37位の置換により、並びにセリン、システイン、アスパラギン、アラニンからなる群から選択されるアミノ酸による Gin 195位の置換により生産された酵素変異体を得た。

これらは、各々、以後、37A、37V、37I、37L、195S、195C、195N、195Aと呼ぶ。更に、Tyr 37 及びGin 195の両方の置換により生産された二重変異酵素を得た。これらは、以後、各々AS、VS、IS、LS、AC、VC、IC、LC、AN、VN、IN、LN、AA、VA、IA、LAと呼ぶ。これらを表にして表1に示す。

遺伝子操作のために用いた全ての酵素は宝酒造、東洋紡、またはニューイングランドバイオラボ (New England Biolabs (MA, USA)) から購入した。遺伝子操作のための条件は、その酵素の供給元の助言に従った。

実施例5 (基質特異性アッセイ)

これらの酵素変異体の基質特異性を評価するために、以下の3種のアッセイ方法を用いた。

アミノアシル化反応の反応産物の1つであるピロリン酸をピロフォスファダーゼで分解して生産される無機リン酸を定量する事で、アミノアシル化反応を測定することがロイド (Lloyd) らによって記載されている (Nucleic Acids Research vol23 (1995) pp2886-2892)。本発明の一つ目の方法では、この方法を簡略化し、無機リンをバイオモルグリーン (Bio mol green (フナコシ)) を使用して検出することで、アミノアシル化反応の測定を行った。測定のために、得られた各々の酵素を、37℃で1時間、0.05 ml の緩衝液B、1 mM ATP (生化学工業) 30 μM粗精製チロシルtRNA、100 μMチロシンまたは0.5 mM 3-ヨードチロシンと共に保温した。その反応を停止させるために、0.1 ml のバイオモルグリーンを加えた。その上清の吸光度を630 nmにおいて測

定した。結果を表2及び表3に示す。

表2は、野生型、8個の一アミノ酸変異酵素のアミノアシル化活性を記号で示したものであり、表3は野生型、37V及び16個の二重変異酵素のアミノアシル化活性を同じく記号で示したものである。各表共に***>**>*>-の順に活性が高いことを示す。

Tyr37及びGln195の他のアミノ酸への置換により得られた酵素変異体に関して、3位置換チロシンアナログに対するアミノアシル化活性を実質的に増加させた。一方、相対的に、これらのタンパク質の、チロシンについての特異的アミノアシル化活性は、減少する。それゆえ、これらの酵素変異体の相対的チロシンアナログ/チロシン比は野生型酵素のそれより高い。

2つ目の方法では、ロイド(Lloyd)ら方法(Nucleic Acids Research vol23(1995)pp2886-2892)によりアッセイした。得られた各々の酵素を37℃で6分間、0.4mlの緩衝液B、1mM ATP(生化学工業)100μM粗精製チロシルtRNA、200μMチロシンまたは3-ヨードチロシンと共にインキュベーションした。アミノアシル化活性の単位を分当りに放出されたリン酸の濃度として表した。結果を表4に示す。

表4は、二重変異酵素のアミノアシル化活性を示したものである。4つの二重変異酵素はTyr37及びGln195の両方の変異の利点を組み合わせる。例えば、VCの相対的チロシンアナログ/チロシン比は10を超え、その特異的アミノアシル化活性は、Gln195に更なる変異の導入のため、单一変異酵素37Vより高い。VN、VS、及びACは、相対チロシンアナログ/チロシン比及び特異的アミノアシル化活性においてVCより劣るが、一アミノ酸置換体よりも高い相対チロシンアナログ/チロシン比及び特異的アミノアシル化活性を有する。

表4に示す結果から、位置37及び195における変異を組み合わせることはその酵素の基質特異性を劇的に変化させ、3位置換チロシンアナログについてのアミノアシル化活性を増加させることができると結論づけることができる。酵素変異体の中で、VC、VN、及びACが最も注目すべき特性及び適用可能性を有する。

3つ目の方法では、tRNA全長に対するチロシンまたは3-ヨードチロシン

に対するアミノアシル化活性を、ウォルフソン (Wolfson) らの方法 (Wolfson, A. D. et al, RNA, 4 (1998), 1019-1023) による酸性ポリアクリルアミド電気泳動と同様の方法によりアッセイした。チロシンまたはヨードチロシンは 200 μM、それぞれの酵素は 50 nM で 37 °C で 3 分間、保温したのち、電気泳動を行った。二重変異酵素のアミノアシル化活性の結果を、第 1 図に図面に代わる写真で示す。第 1 図の左側の 3 個は野生型であり、真ん中の 3 個は 37 位をバリンに改変した酵素 (37V) であり、右側の 3 個は 37 位をバリンに 195 位をシステインに改変した酵素 (VC) である。それぞれの 3 個は左からアミノ酸を添加しない場合 (w/o aa)、3-ヨードチロシン (200 μM) を添加した場合 (I-Tyr)、チロシン (200 μM) を添加した場合 (Tyr) を示す。

その結果、VC は、チロシンアナログに対する特異性が高いことが判った。

実施例 6 (非天然アミノ酸を部位特異的に挿入されたタンパク質の生産)

得られた二重変異体 VC と、大腸菌チロシン tRNA 由来のアンバーサプレッサー tRNA を用いて、コムギ胚芽の無細胞タンパク合成系のバッチ法による反応によって、ヨードチロシンを含有するタンパク質を作成した。

コムギ胚芽系の無細胞タンパク合成は、プロテイオス無細胞系蛋白質合成キット (PROTEIOS cell-free protein synthesis kit (Toyobo)) を用いて行った。目的タンパク質としては、その C 末に、スペーサー配列を介して His タグを付加した短鎖型 c-H-Ras (Milburn et al., Science, vol 247 (1990) pp939-945) である。タンパク質の発現に用いるプラスミドは、キットに添付されたプラスミド pEUV3-NII の SpeI-SalI 部位に、短鎖型 c-H-Ras の C 末にスロンビン認識配列と His タグを付加した配列に対応する遺伝子を挿入することで作成した。その結果として予想される翻訳産物のアミノ酸配列をアミノ酸の 1 文字標記で示すと次のとおりである。

M T E Y K L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I Q N H F V D	30
E Y D P T I E D S Y R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A G	60
Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L C V F A I N N T K S F	90
E D I H Q Y R E Q I K R V K D S D D V P M V L V G N K C D L	120

A A R T V E S R Q A Q D L A R S Y G I P Y I E T S A K T R Q	150
G V E D A F Y T L V R E I R Q H K L R K L G S L V P R G S H	180
H H H H H	185

翻訳反応は、キットの条件に、さらにヨードチロシンを終濃度で0. 6 mM加えることで行った。産物は、4-12% NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen)を用いて電気泳動した。このゲルに対し、イメージアナライザFLA-2000 (image analyzer FLA-2000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)) を用いて、RIのカウント、またはシプロータンジェリン蛋白質ゲル染色(Cypro-tangerine protein gel stain (Molecular probes)) を用いて染色されたタンパク質のバンドを定量した。

このタンパク質の32番目のコドンをアンバーコドンに置換したコンストラクションから作成したmRNAを鋳型とした翻訳では、全長のタンパク質の生産は、TyrRS、サブレッサーtRNAの両方が存在することに依存した(第2図)。このことより、用いたサブレッサーtRNAが、コムギ胚芽内在性のアミノアシルtRNA合成酵素によってほとんどアミノアシル化されないことがわかる。アンバーサブレーションによる合成量は、アンバーコドンが無いコントロールの3~4割であった。タンパク質の合成量を増やすために、サブレーションによる反応を、透析法を用いて3日間行った。この場合の生産量は1mlの反応内液当たりに換算して0.1mg以上であり、タンパク質を用いた様々な実験を行うに十分な量のタンパク質を合成できることができた。

実施例7 (無細胞タンパク合成の産物の質量分析)

実際にペプチド鎖のアンバーコドンに対応する位置にヨードチロシンが挿入されていることを質量分析によって調べた。LC-MS解析のために、合成されたタンパク質をNi-NTA磁気アガロースビーズ (Ni-NTA magnetic agarose beads (Qiagen)) を用いて精製した。精製物をNuPAGEビストリスゲル (NuPAGE Bis-Tris gel) を用いた電気泳動によってさらに精製し、目的産物に対応する21kDaのバンドをゲルから切り出した。0.1μgのアクロモバクタープロテアーゼI (Achromobacter Protease I (Lys-C)) を用いた消化を、ゲル片中

で0.1% SDSを含む0.05M Tris-HCl (pH 9) 中で、37°Cで12時間行った。消化されて生じたペプチドは、DEAE-5PW (1 x 10 mm; Tosoh, Tokyo) とMightysil C18 (1 x 50 mm; Kanto chemical, Tokyo) を連結したモデル1100液体クロマトグラフィー (model 1100 liquid chromatograph (Hewlett Packard)) を用いて、30分かけた2-60%溶媒B (solvent B) の直線勾配によって分離した。検出は、ジヨードアレイ検出器 (diode-array detector) で行った。溶媒A (solvents A) 及び溶媒B (solvents B) は、それぞれ0.09% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液と、0.075% (v/v) トリフルオロ酢酸-80% (v/v) アセトニトリルであった。溶出物は、ESIプローブ (ESI probe) を用いたフィニガンLCQイオントラップ質量分析機 (Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer) によって解析した。タンデムMSシーケンシングは、Rasの32番目のアミノ酸を含むLys-Cフラグメントの $[M + 2H]^{2+}$ に対応するフラグメントに対して行った。

翻訳産物を消化したフラグメントのうち、N末から32番目のアミノ酸を含むフラグメント (Ser17-Lys42、K3フラグメントと称す)に着目して解析を行った。その結果、アンバーサプレッションによって生じたK3フラグメントには、1残基のチロシンがヨードチロシンに置換された質量に対応するものが大部分で、一部のみがヨードチロシンを含まない質量を持っていた。また、アンバーコドンに対応する部位に他のアミノ酸が誤って挿入されたK3フラグメントは検出されなかった。アンバーコドンに対応して挿入されたヨードチロシンとチロシンの割合をクロマトグラムの吸光度から検討した結果、アンバーサプレッションによって、K3フラグメントの95%以上がヨードチロシンを含む一方、アンバーコドンに対応してチロシンが挿入された割合は5%以下であることがわかった。一方、通常のチロシンコドンによってはヨードチロシンが混入しないことを、アンバーコドンを含まないmRNAからの翻訳産物の解析では、チロシンの代わりにヨードチロシンを含んだ場合に対応する質量を持つフラグメントが検出されないことにより確認した（第3図）。

さらにK3-321Yフラグメントのタンデムマス解析により、このフラグメ

ントの部分配列である P h e - V a l - A s p - G l u - (ヨード-T y r) - A s p を確認した。

産業上の利用可能性

本発明は、新規なチロシル t R N A 合成酵素の変異体、及びその新規な改変方法を提供するものである。本発明の改変方法によれば、チロシル t R N A 合成酵素の選択性や基質特異性の改変を、簡便な方法で、効率よく行うことができる。

本発明のチロシル t R N A 合成酵素の変異体を使用することにより、ペプチドあるいはタンパク質の調製の場におけるアミノアシル化反応を利用して、天然アミノ酸に加えて非天然アミノ酸である 3 位置換チロシンを部位特異的に挿入することが可能となる。

また、本発明のチロシル t R N A 合成酵素の変異体を用いて、効率的で、選択的で、かつ大量生産に適したアロタンパク質の製造が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. チロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変して、元の天然のチロシンよりも非天然型の 3 位置換チロシンをより効率良く取り込むことができるアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素。
2. チロシンの 3 位置換体アミノ酸が、3-ハロゲン置換チロシンである請求の範囲第 1 項に記載のチロシル t RNA 合成酵素。
3. ハロゲンがヨウ素である請求の範囲第 2 項に記載のチロシル t RNA 合成酵素。
4. アミノ酸の改変が、チロシル t RNA 合成酵素の立体構造に基づいてチロシン又はチロシンの AMP 複合体を認識すると推定される位置のアミノ酸の 2箇所以上を他のアミノ酸に改変したものである請求の範囲第 1 項～第 3 項の何れかに記載のチロシル t RNA 合成酵素。
5. アミノ酸の改変位置が少なくとも、大腸菌由来のチロシル t RNA 合成酵素の 37 位チロシン及び 195 位グルタミンに立体的に相当する位置である請求の範囲第 4 項に記載のチロシル t RNA 合成酵素。
6. 大腸菌由来のチロシル t RNA 合成酵素の 37 位チロシンに立体的に相当する位置が、バリン、ロイシン、イソロイシン、又はアラニンであり、かつ、195 位グルタミンに立体的に相当する位置が、アラニン、システイン、セリン、又はアスパラギンである請求の範囲第 5 項に記載のチロシル t RNA 合成酵素。
7. チロシル t RNA 合成酵素が、細菌由來のものである請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれかに記載のチロシル t RNA 合成酵素。
8. 細菌が、大腸菌である請求の範囲第 7 項に記載のチロシル t RNA 合成酵素。

9. チロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変することにより、元の天然のチロシンよりも非天然型の 3 位置換チロシンをより効率良く取り込むことができるアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素を製造する際に、チロシル t RNA 合成酵素がチロシン又はチロシンの AMP 複合体と結合する位置のアミノ酸を 3-D 構造に基づいて決定し、その位置のアミノ酸を他のアミノ酸に改変することを特徴とするチロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変する方法。

10. 改変されるアミノ酸が 2 個以上である請求の範囲第 9 項に記載のチロシル t RNA 合成酵素のアミノ酸配列を改変する方法。

11. 請求の範囲第 1 項～第 8 項のいずれかに記載のアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素を用いて、タンパク質生産系により非天然型のチロシンを含有する蛋白質を製造する方法。

12. タンパク質生産系が、細胞内のタンパク質翻訳系である請求の範囲第 1 項に記載の方法。

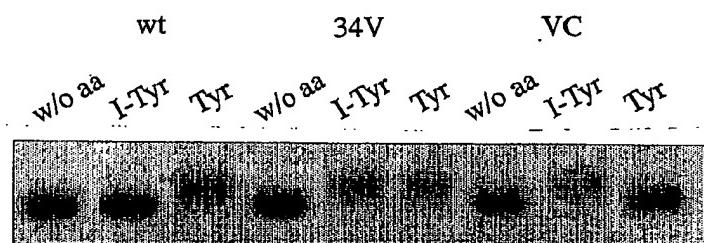
13. タンパク質生産系が、無細胞翻訳系である請求の範囲第 11 項に記載の方法。

14. 請求の範囲第 1 項～第 8 項のいずれかに記載のアミノ酸配列が改変されたチロシル t RNA 合成酵素をコードする遺伝子により形質転換された細胞。

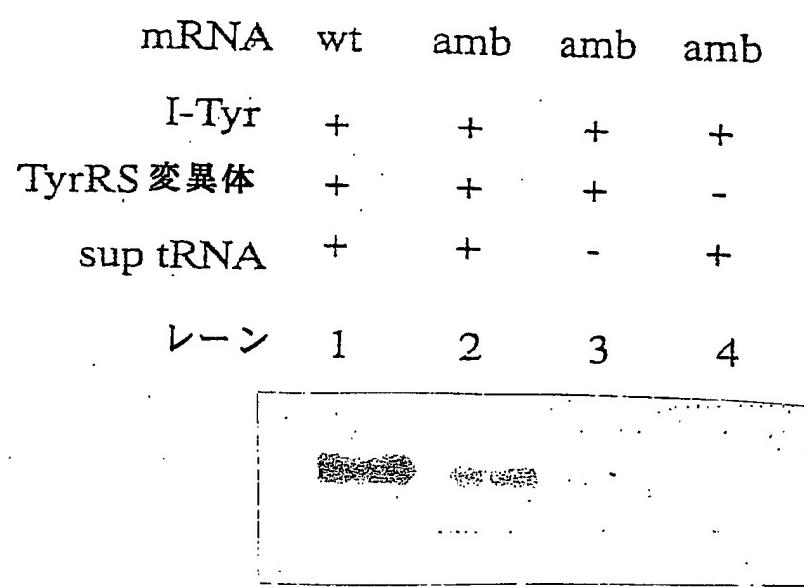
15. 細胞が、原核細胞である請求の範囲第 14 項に記載の細胞。

16. 細胞が、真核細胞である請求の範囲第 14 項に記載の細胞。

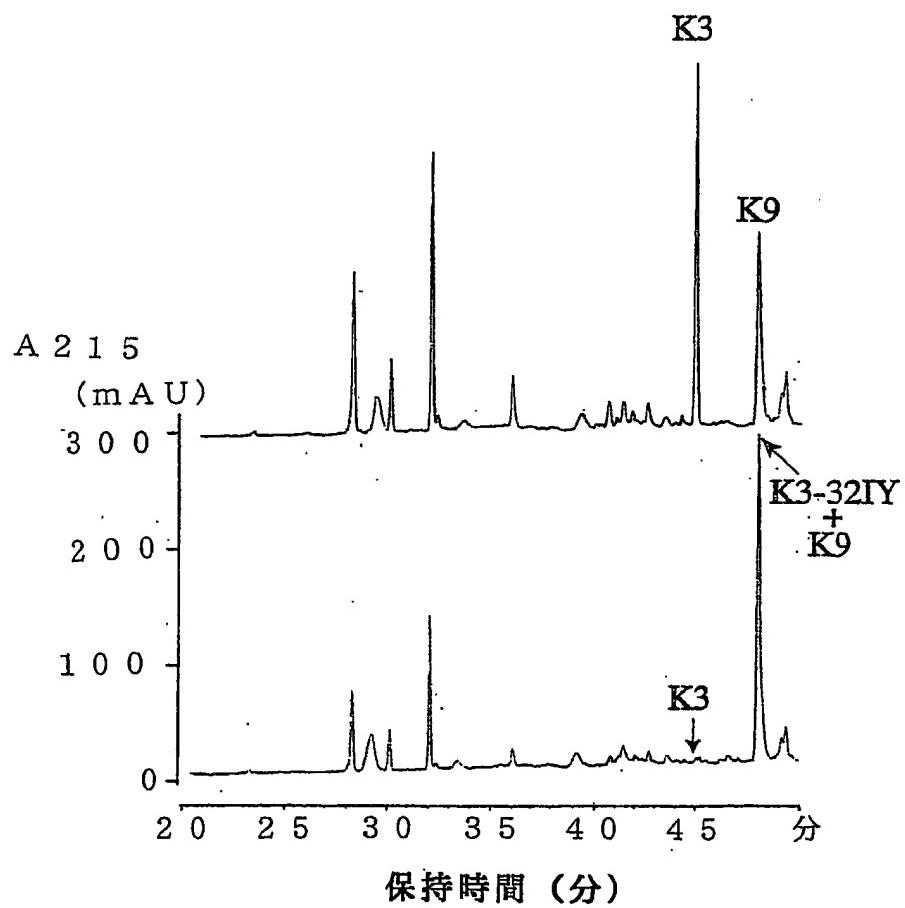
第 1 図



第 2 図



第 3 図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A modified aminoacyl-tRNA snythetase

<130> JA909400

<150> JP2001-234135

<151> 2001-08-01

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 424

<212> PRT

<213> Escherichia Coli

<400> 1

Met Ala Ser Ser Asn Leu Ile Lys Gln Leu Gln Glu Arg Gly Leu Val

1

5

10

15

Ala Gln Val Thr Asp Glu Glu Ala Leu Ala Glu Arg Leu Ala Gln Gly

20

25

30

Pro Ile Ala Leu Tyr Cys Gly Phe Asp Pro Thr Ala Asp Ser Leu His

35

40

45

Leu Gly His Leu Val Pro Leu Leu Cys Leu Lys Arg Phe Gln Gln Ala

50

55

60

Gly His Lys Pro Val Ala Leu Val Gly Gly Ala Thr Gly Leu Ile Gly

65

70

75

80

Asp Pro Ser Phe Lys Ala Ala Glu Arg Lys Leu Asn Thr Glu Glu Thr

85

90

95

Val Gln Glu Trp Val Asp Lys Ile Arg Lys Gln Val Ala Pro Phe Leu

100

105

110

Asp Phe Asp Cys Gly Glu Asn Ser Ala Ile Ala Ala Asn Asn Tyr Asp

115

120

125

Trp Phe Gly Asn Met Asn Val Leu Thr Phe Leu Arg Asp Ile Gly Lys

130

135

140

His Phe Ser Val Asn Gln Met Ile Asn Lys Glu Ala Val Lys Gln Arg

145

150

155

160

Leu Asn Arg Glu Asp Gln Gly Ile Ser Phe Thr Glu Phe Ser Tyr Asn

165

170

175

Leu Leu Gln Gly Tyr Asp Phe Ala Cys Leu Asn Lys Gln Tyr Gly Val

180 185 190

Val Leu Gln Ile Gly Gly Ser Asp Gln Trp Gly Asn Ile Thr Ser Gly

195 200 205

Ile Asp Leu Thr Arg Arg Leu His Gln Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr

210 215 220

Val Pro Leu Ile Thr Lys Ala Asp Gly Thr Lys Phe Gly Lys Thr Glu

225 230 235 240

Gly Gly Ala Val Trp Leu Asp Pro Lys Lys Thr Ser Pro Tyr Lys Phe

245 250 255

Tyr Gln Phe Trp Ile Asn Thr Ala Asp Ala Asp Val Tyr Arg Phe Leu

260 265 270

Lys Phe Phe Thr Phe Met Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala Leu Glu Glu

275 280 285

Glu Asp Lys Asn Ser Gly Lys Ala Pro Arg Ala Gln Tyr Val Leu Ala

290 295 300

Glu Gln Val Thr Arg Leu Val His Gly Glu Glu Gly Leu Gln Ala Ala

305 310 315 320

Lys Arg Ile Thr Glu Cys Leu Phe Ser Gly Ser Leu Ser Ala Leu Ser

325 330 335

Glu Ala Asp Phe Glu Gln Leu Ala Gln Asp Gly Val Pro Met Val Glu

340

345

350

Met Glu Lys Gly Ala Asp Leu Met Gln Ala Leu Val Asp Ser Glu Leu

355

360

365

Gln Pro Ser Arg Gly Gln Ala Arg Lys Thr Ile Ala Ser Asn Ala Ile

370

375

380

Thr Ile Asn Gly Glu Lys Gln Ser Asp Pro Glu Tyr Phe Phe Lys Glu

385

390

395

400

Glu Asp Arg Leu Phe Gly Arg Phe Thr Leu Leu Arg Arg Gly Lys Lys

405

410

415

Asn Tyr Cys Leu Ile Cys Trp Lys

420

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(44)

<400> 2

ggaattccat atggcaagca gtaacttgtat taaacaatttgcagg 44

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(50)

<400> 3

gccgaagctt gtcgacatttc cagcaaatca gacagtaattt ctttttaccg 50

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(40)

<400> 4

aggatcgaag ccgcaagcga gcgcgatcgg gccttgcgcc

40

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(40)

<400> 5

aggatcgaag ccgc~~a~~nnnga gcgcgatcgg gccttgcgcc

40

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<400> 6

acggtgtgggt gctgtctatt ggtaggttc tg acc

33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<400> 7

acggtgtgggt gctggcaatt ggtaggttc tg acc

33

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(33)

<400> 8
acggtgtggt gctgaacatt ggtggttctg acc 33

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(33)

<400> 9

acggtgtgggt gctgtgcatt ggtgggtctg acc

33

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<400> 10

tccatcgat ccaaccagac tgcggccct tc

32

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 11

gatcatctgg ttaacggaga agtgtttgc

30

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 12

gaccttcctg cgcgatattg gcaaac

26

<210> 13

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Modification of human protein

<400> 13

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1

5

10

15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr

20

25

30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly

35

40

45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr

50

55

60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys

65

70

75

80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr

85

90

95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val

100

105

110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg

115

120

125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr

130

135

140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Gly Ser Leu Val Pro
165 170 175

Arg Gly Ser His His His His His
180 185

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/52, C12N9/00, C07B61/00, G01N33/48, //G06F17/30,
G06F17/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/52, C12N9/00, C07B61/00, G01N33/48, G06F17/30,
G06F17/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE(STN), PDB
EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	OHNO S. et al., Changing the Amino Acid Specificity of Yeast Tyrosyl-tRNA Synthetase by Genetic Engineering, J. Biochem. 01 September, 2001 (01.09.01), Vol.130, No.3, 417-423, Fig.2, table II, table III	1-8
Y	HAMANO-TAKAKU F. et al., A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine, J. Biol. Chem. 22 December, 2000 (22.12.00), Vol.275, No.51, pages 40324 to 40328; Fig.3	1-8
Y	BAIN J. D. et al., Site-Specific Incorporation of Nonnatural Residues during In Vitro Protein Biosynthesis with Semisynthetic Aminoacyl-tRNAs, Biochemistry (1991), Vol.30, No.22, pages 5411 to 5421, abstract.	1-4, 7-8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 April, 2002 (08.04.02)

Date of mailing of the international search report
16 April, 2002 (16.04.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00118

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BARKER D. G. et al., The tyrosyl-tRNA synthetase from <i>Escherichia coli</i> , FEBS Letters (1982), Vol.150, No.2, pages 419 to 423; Fig. 2	5, 6
Y	WINTER G. et al., The Amino Acid Sequence of the Tyrosyl-tRNA Synthetase from <i>Bacillus Stearothermophilus</i> , Eur. J. Biochem. (1983), Vol.132, No.2, pages 383 to 387; Fig.2	5, 6
Y	BRICK P. et al., Structure of Tyrosyl-tRNA Synthetase Refined at 2.3 Å Resolution, J. Mol. Biol. (1989), Vol.208, No.1, pages 83 to 98 Figs.7, 8	5, 6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl' C12N15/52, C12N9/00, C07B61/00, G01N33/48,
 //G06F17/30, G06F17/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl' C12N15/52, C12N9/00, C07B61/00, G01N33/48,
 , G06F17/30, G06F17/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
 MEDLINE(STN), PDB
 EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	OHNO S. et al., Changing the Amino Acid Specificity of Yeast Tyrosyl-tRNA Synthetase by Genetic Engineering, J. Biochem. (2001-Sep.-01), Vol. 130, No. 3, 417-423 Fig. 2, TableII, TableIII参照	1-8
Y	HAMANO-TAKAKU F. et al., A Mutant <i>Escherichia coli</i> Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine, J. Biol. Chem. (2000-Dec.-22), Vol. 275, No. 51, p. 40324-40328 Fig. 3参照	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 08.04.02	国際調査報告の発送日 16.04.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 4 B 9453  電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BAIN J. D. et al., Site-Specific Incorporation of Nonnatural Residues during In Vitro Protein Biosynthesis with Semisynthetic Aminoacyl-tRNAs, Biochemistry (1991), Vol. 30 No. 22, p. 5411-5421 要約参照	1-4, 7-8
Y	BARKER D. G. et al., The tyrosyl-tRNA synthetase from <i>Escherichia coli</i> , FEBS Letters (1982), Vol. 150, No. 2, p. 419-423 Fig. 2参照	5, 6
Y	WINTER G. et al., The Amino Acid Sequence of the Tyrosyl-tRNA Synthetase from <i>Bacillus Stearothermophilus</i> , Eur. J. Biochem. (1983), Vol. 132, No. 2, p. 383-387 Fig. 2参照	5, 6
Y	BRICK P. et al., Structure of Tyrosyl-tRNA Synthetase Refined at 2.3 Å Resolution, J. Mol. Biol. (1989), Vol. 208, No. 1, p. 83-98 Fig. 7, 8参照	5, 6